韓 法 醫 誌 : 第28卷 · 第1號
Kor. J. Legal Med. Vol. 28, No. 1

미량의 분해된 DNA 시료의 간편 정량과 DNA 프로필 분석

연세대학교 의과대학 법의학과, [2]연세대학교 개인식별연구소, [3]국립과학수사연구소 법의학과
신경진[1, 2] · 유지은 · 정욱희 · 박명진 · 이환영 · 강승철[2] · 이 호[3] · 조상호[1, 2] · 김종열[1, 2]

= Abstract =

Simple Quantification and DNA Profiling from Degraded Low Copy Number DNA Samples

Kyoung-Jin Shin[1, 2], Ji-Eun Yoo, Ukhee Chung, Myung Jin Park, Hwan Young Lee, Seung-Chul Kang[2], Ho Lee[3], Sang-Ho Cho[1, 2], Chong-Youl Kim[1, 2]

Department of Forensic Medicine, College of Medicine, Yonsei University

[2]Human Identification Research Institute, Yonsei University

[3]Department of Forensic Medicine, National Institute of Scientific Investigation

DNA quantification is important to ensure the consistency and the reliability in the interpretation of degraded low copy number DNA typing. We applied the simple PCR quantification method using fluorescently labeled primers for the amplification of mtDNA and amelogenin gene in 50 year old skeletal remains (e.g. bone and tooth). K562 DNA was serially diluted and used as a standard for concentration marker to gauge the amount of DNA from PCR versus the peak area. The quantities of DNA extracted from bones and teeth did not show significant difference in the analyses both using mtDNA and amelogenin gene as an amplification target.

To test the efficiency of DNA profiling of degraded low copy number DNA samples, mtDNA PCR quality evaluation and DNA typing for 16 autosomal STR and 9 Y chromosomal STR loci were performed and the correlation between DNA quantities and PCR amplification efficiencies of the samples was analyzed. The DNA quantities assayed by the simple method suggested in the present study could be good indicator for mtDNA and STR analysis. As the allele drop-out was observed in less than 0.050ng DNA samples, at least 0.100ng of DNA is required to produce informative STR profiles. Also, STRs with less than 200bp amplification sizes produce efficient DNA profiles in most cases. Therefore, the development of mini-STRs with less than 200bp amplification sizes is expected to improve DNA typing in degraded low copy number DNA. Y-STRs are easy to detect allele drop-out or drop-in, and accordingly the efficiency test of Y-STRs as well as autosomal STRs for profiling of degraded low copy number DNA samples is thought to be important.

Key Words : Quantification, Bone, Tooth, mtDNA, Powerplex 16, Y-STR

책임저자 : 신 경 진
(120 - 752) 서울시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 법의학과
전화 : (02) 361 - 5775, FAX : (02) 362 - 0860, E - mail : kjshin@yumc.yonsei.ac.kr
본 연구는 연세대학교 의과대학 2001년도 교수연구비에 의하여 이루어졌음 (과제번호 : 2001 - 5호).

서 론

분자생물학적 기법의 발전과 유전자의 다형성에 대한 정보가 밝혀져 법의학에 도입됨으로써 유전자검사는 매우 빠르게 발전되어 왔으며, 그 사회적 요구도 계속 증가하고 있는 추세이다. 법의학적 유전자검사에서는 DNA상에 존재하는 짧은연쇄반복(Short Tandem Repeat; STR)을 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)으로 증폭하여 그 유전자형을 결정하는 것이 일반적인 방법이다. STR은 대립유전자의 크기가 짧으며, 중합효소연쇄반응을 통해 매우 소량의 시료로부터도 유전자형을 결정지을 수 있고, 보통 10-16 유전좌를 동시에 증폭할 수 있기 때문에 식별력도 매우 높아 법의학적 유전자검사에 유용한 특징이 많다[1, 2]. 특히, 1998년 미국 FBI에 주요 범죄자의 STR 유전자형을 분석하여 저장, 검색하는 데이터베이스 즉 CODIS(Combined DNA Index System)가 설치된 이후 STR에 기초한 유전자검사는 세계적인 표준으로 빠르게 정착되었다[3]. 한편, 발전된 STR 분석법에도 불구하고, 핵 유전자(Nuclear DNA; nDNA)에 대한 분석이 어려운 경우가 있으며, 이 때에는 한 개의 세포 내에 그 수가 많을 뿐 아니라 nDNA보다 안정성이 높아 오랜 기간이 지나도록 파괴되지 않고 남아 있을 수 있는 미토콘드리아 DNA (Mitochondrial DNA; mtDNA)에 대한 분석이 시행되고 있다[4, 5]. 특히, mtDNA의 전사조절부위에 있는 과변이 영역은 염기의 삽입이나 소실, 혹은 점 돌연변이에 의한 유전자 다형성이 나타나고 있어 법의학적 유전자검사에서 주요 분석 대상이 된다. mtDNA 분석은 STR 분석에 비해 민감도는 매우 높으나 식별력이 상대적으로 낮으므로, 사건과 관련된 다른 정황증거가 충분한 경우나 관련자의 배제를 위한 검사에 주로 이용되고 있다.

한 개체 혹은 세포가 죽음에 이르면 DNA는 자신의 세포 내에 있는 핵산분해효소에 의해 자가분해 되며, 시간이 경과함에 따라 외부의 온도, 습도, pH, 자외선 혹은 미생물에의 노출과 같은 환경 요인에 의해 서서히 분해되어 파괴된다. 또한 추출된 DNA에는 토양으로부터 유리된 humic acid, 유골 자체에 있는 지방산, 박테리아나 곰팡이에서 유래된 DNA 등이 혼재되어 있어 PCR 기반의 human DNA의 증폭에 억제 물질로 작용한다[6-8]. 더구나 이러한 시료에서 추출된 DNA의 양은 매우 적으며, 유전자검사 과정에서 오염에 철저히 대처한다고는 하지만 낮은 수준의 오염이 잔존할 가능성이 많다[9]. 따라서, PCR에 기반한 미량의 분해된 DNA 시료의 DNA 프로필 분석은 많은 노력과 시간 그리고 비용이 소모되며, 많은 경우에 있어 유전자의 소실(allele drop-out), 추가(allele drop-in)와 같은 유전자형 결정에 어려움이 따르게 되어 완전한 결과를 얻지 못 할 수도 있다[10-13].

그러므로, 미량의 분해된 DNA 시료로부터 PCR에 의한 mtDNA나 nDNA의 일관성과 신뢰성이 있는 결과를 도출하기 위해서는 시료로부터 추출된 DNA를 정량하는 것이 매우 중요하다. DNA 정량을 통하여 시료로부터 추출된 DNA가 mtDNA나 nDNA 분석에 적절한 지를 평가하는 데 도움이 되고, PCR을 수행할 때에 사용되는 DNA의 양을 결정할 수 있다. 나아가 DNA의 상태에 따라서 원하는 수준의 통계학적인 결과를 얻기 위하여 필요한 유전자 분석의 횟수도 정할 수 있어, 제한된 시료를 최적으로 사용할 수 있게 해준다. 또한 PCR에 기반한 정량은 DNA의 분해 정도, PCR 억제 물질의 존재 여부, 그리고 성별에 대한 정보도 제시하여 준다[14].

초기의 DNA 정량은 방사선동위원소로 표지된 probe로 D17Z1 유전자에 대한 혼성화를 이용하였으며, 나중에는 형광 probe를 이용한 정량법을 사용하게 되었다. 그 외에 competitive PCR, Picogreen system, AluQuant system, Pyrosequencing system, Real-time PCR 등의 정량법이 소개되어 있다[14, 15]. 소개된 여러 방법들 중 Taq DNA polymerase의 5' exonucelase activity를 분석하여 매우 빠르고 정밀하게 real-time PCR 정량이 가능한 TaqMan System (Applied Biosystems, Foster City, CA)은 법의학적 시료의 평가에 유용한 많은 장점이 있어 다양한 방법으로 응용되고 있다[15, 16]. 그러나, TaqMan System은 여러가지 장점이 있음에도 불구하고 고가의 전용 장비와 관련 형광프라이머 및 probe를 제조하여야 하는 불편함이 있는 바, 본 연구에서는 대부분의 법의학 실험실에서 사용하고 있는 자동염기서열 분석기를 이용한 간단한 DNA의 정량법을 제시해 보고자 한다.

또한, 법의학적 유전자검사에서는 제한된 매우 귀중한 DNA 시료를 최대한 유용하게 사용하기 위하여 DNA 프로필 분석이 어느 정도 가능한 지에 대한 평가가 필요하다. 즉, mtDNA 과변이 영역의 분석에서는 염기서열결정에 충분한 PCR 산물을 얻기 위한 조

건을 제시할 필요가 있으며, STR 분석에서는 DNA 정량의 결과를 바탕으로 어느 정도 크기의 PCR 생성물을 갖는 STR이 효과적으로 분석될 수 있는지에 대한 연구는 미미한 것 같다. 한편, 미량의 분해된 DNA 시료에서의 DNA 프로필 분석은 주로 상염색체 STR을 대상으로 하여 이루어져 왔으나[17, 18], Y 염색체 STR (Y-STR) 유전자는 재조합 없이 아버지로부터 아들에게 유전되기 때문에 상염색체 STR를 이용한 방법만으로는 해결할 수 없는 경우에 보조적으로 이용될 수 있다. 특히 Y-STR 유전자는 대부분의 대립유전자가 1개이기 때문에 상염색체 STR 검사체계에서 나타나는 대립유전자의 소실이나 오염에 의한 대립유전자의 추가를 쉽게 추적할 수 있다는 기술적인 장점을 지니고 있으나[19, 20] 이에 대한 연구는 보고된 적이 없는 상황이다. 이에, 대표적인 상염색체 STR과 Y-STR을 대상으로 미량의 분해된 DNA 시료의 정량과 STR 분석 정도와의 상관관계를 알아보고, STR 분석에서 나타나는 문제점을 분석해 보고자 한다.

본 연구에서는 먼저 일반적인 법의학 실험실에서 구현 가능한 간단한 DNA 정량법을 제시해보고, 이를 바탕으로 미량의 분해된 시료의 mtDNA와 nDNA의 검사에 얼마나 유용하게 사용될 수 있는 지 평가해 보고자 한다. 나아가 여기서 발생하는 문제점을 보완할 수 있는 방법에 대해서도 논의해 보고자 한다.

연구재료 및 방법

1. 연구재료

6·25 전쟁 50주년 기념사업의 일환으로 추진되고 있는 6·25 전사자 유해 발굴사업과 관련하여 육군 유해발굴단에 의해 발굴된 유해 중 유전자검사를 위해 채취된 시료의 장골 일부와 치아를 각각 15개씩 무작위로 선정하였다.

2. 연구방법

가. 시료의 전처리 및 가루화

뼈 시료는 약 1×3-5 cm 크기로 조각을 만든 다음 그 중 한 개의 조각을 선택하여 치과용 드릴로 외면에 부착된 이물질을 깨끗이 제거하였으며, 치아 시료는 가능한 구치로 선택한 다음 치과용 고속드릴로 외면에 부착된 이물질을 깨끗이 제거한 후 증류수로 세척한 후 건조시켰다. 각 시료는 30분간 자외선으로 처리한 후, 액체질소와 6750 Freezer/Mill(SPEX CentriPrep, Metuchen, NJ)을 사용하여 가루로 만들었다[21].

나. DNA의 추출

가루로 만든 시료를 extraction buffer(0.5 M EDTA pH 8.0, 0.5% SDS)와 Proteinase K(1 mg/ml)가 혼합된 용액 속에서 56°C에서 12-24시간 부란시킨 후 QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN, Germany)을 이용하여 Yang 등[22]이 제시한 방법에 따라 DNA를 추출하였다.

다. DNA의 정량

1) 형광프라이머를 이용한 미토콘드리아 DNA 정량

K562 표준 DNA를 각각 0.020, 0.010, 0.004, 0.002, 0.001 ng/ul가 되도록 차례로 희석한 것과 시료에서 추출된 DNA에 대하여 다음과 같이 PCR을 수행하였다. PCR 혼합물은 1 ul template DNA, 1ul 10 × Gold STR buffer(Promega, Madison, WI), 1.5 U AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA)와 각각 0.2 uM의 F16190 primer와 형광물질 FAM을 부착한 R16410 primer (Table 1)를 포함하도록 하여 최종 반응 부피는 10 ul가 되도록 하였다. PCR 반응은 PTC-200 DNA engine(MJ Research, Waltham, MA)을 이용하여, 95 ℃ 에서 11분간 가열한 다음 94 ℃ 에서 1분, 56 ℃ 에서 1분, 72 ℃ 에서 1분으로 이루어진 총 28회의 온도순환 후 60 ℃ 에서 30분간 반응시켰다.

PCR 산물은 통상의 방법에 따라 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA)에서 전기영동하여 분리한 후, GeneScan software 3.1(Applied Biosystems, Foster City, CA)을 이용하여 증폭 산물이 나타내는 peak의 면적을 측정하였다.

2) Agarose gel로 평가한 미토콘드리아 DNA의 증폭 정도

0.010, 0.001 ng/ul K562 표준 DNA, 증류수, 시료에서 추출한 DNA에 대하여 다음과 같이 PCR을 수행하였다. PCR 혼합물은 5 ul template DNA, 3u1 10 × PCR buffer(Applied Biosystems, Foster City, CA), 200uM dNTP, 2.5 U AmpliTaq Gold DNA Polymerase, 200 ng/ul BSA, 각각 0.2 uM의 F16144와 R16410 primer (Table 1)를 포함하도록 하여 최

종 반응 부피는 25 ul가 되도록 하였다. PCR 온도순환은 GeneAmp PCR System 9600(Perkin Elmer, CA, USA)을 이용하여, 95 ℃에서 10분간 가열한 다음 95 ℃에서 20초, 56 ℃에서 20초, 72 ℃에서 30초로 이루어진 총 35회의 온도순환 후, 72 ℃에서 7분간 반응시켰다. 동일한 조건에서 40회의 온도순환도 수행하였으며, 각각의 PCR에서 증폭된 산물을 2% agarose gel 상에서 전기영동하여 band intensity를 관찰하였다.

3) Amelogenin 유전자를 이용한 핵 DNA 정량

K562 표준 DNA를 각각 0.100, 0.040, 0.020, 0.010, 0004 ng/ul가 되도록 차례로 희석한 것과 시료에서 추출된 DNA에 대하여 다음과 같이 PCR을 수행하였다. PCR 혼합물은 1 ul template DNA, 1 ul 10 × Gold STR buffer(Promega, Madison, WI), 1.5 U AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA)와 각각 0.2 uM의 형광 물질 HEX를 부착한 amelogenein-F와 amelogenin-R primer (Table 1)를 포함하도록 하여 최종 반응 부피는 10 ul가 되도록 하였다. PCR 반응은 PTC-200 DNA engine(MJ Research, Waltham, MA)을 이용하여, 95 ℃ 에서 11분간 가열한 다음 94 °C 에서 1분, 56 ℃ 에서 1분, 72 ℃ 에서 1분으로 이루어진 총 35회의 온도순환 후 60 ℃ 에서 30분간 반응시켰다.

4) 시료에서 추출된 mtDNA와 nDNA 양 산출

시료에서 추출된 mtDNA와 nDNA의 양을 결정하기 위하여, 연속 희석된 K562 표준 DNA 양과 각각에 해당되는 GeneScan 상의 peak의 면적을 바탕으로 K562 표준 DNA 농도 표지의 standard curve를 최소자승법으로 구하였다. 이 curve를 참고하여 시료에서 추출된 mtDNA와 nDNA의 상대적 양을 각각 비교 측정하였다.

뼈에서 추출된 DNA 양과 치아에서 추출된 DNA 양의 차이를 평가해 보고자 paired t-test를 수행하였으며, mtDNA와 nDNA의 상관도를 조사했다. 최소자승법에 의한 DNA 양 산출, paired t-test, 상관도는 모두 Microsoft Excel을 이용하여 각각의 값을 산출하였다.

다. PowerPlex 16 체계 상염색체 STR 유전자 분석

시료에서 추출된 DNA를 template로 하여 PowerPlex 16 체계에 포함된 상염색체 STR 유전자의 PCR 증폭 정도를 조사하였다. PCR 반응액을 10ul가 되도록 하고, 온도순환을 총 35회 수행한 것을 제외하고 제조사의 지시에 따라 증폭 산물의 유전자형을 결정하였다.

Table 2. Quantity of Mitochondrial and Nuclear DNA Relative to K562 Standard DNA (1 ng/ul)

Sample	Mitochondrial DNA		Nuclear DNA	
	Bone	Tooth	Bone	Tooth
S01	0.004	0.008	0.078	0.219
S02	0.002	0.012	0.017	0.087
S03	0.007	0.001	0.010	0.002
S04	0.008	0.004	0.005	0.028
S05	0.006	0.012	0.080	0.041
S06	0.008	0.000	0.015	0.000
S07	0.006	0.010	0.041	0.101
S08	0.003	0.003	0.001	0.000
S09	0.006	0.014	0.030	0.001
S10	0.012	0.006	0.026	0.009
S11	0.005	0.007	0.010	0.023
S12	0.003	0.012	0.051	0.140
S13	0.003	0.017	0.032	0.065
S14	0.001	0.006	0.003	0.015
S15	0.009	0.012	0.134	0.015
Mean	0.006	0.008	0.036	0.050
p-value (T-test)	0.124		0.382	
Correlation	0.343			

Table 1. Primer Sequences Used in Quantification of DNA

Primer	Sequence
F16144	5'-TGA CCA CCT GTA GTA CAT AA-3'
F16190	5'-CCC CAT GCT TAC AAG CAA GT-3'
R16410	5'-FAM-GAG GAT GGT GGT CAA GGG AC-3'
Amelogenin-F	5'-HEX-CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG-3'
Amelogenin-R	5'-ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAG CTG-3'

라. Y-STR 유전자 분석

Park 등[20]의 연구에서 한국인에서 minimum haplotype(DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385)의 결정을 위해 사용되었던 multiplex PCR 체계로 Y-STR 유전자의 PCR 증폭 정도를 평가해 보았다. Park 등의 논문에서 제시되었던 primer와 PCR 조건을 그대로 적용하여 총 35회의 PCR의 온도순환을 수행하였으며, 기술된 방법에 따라 증폭 산물의 유전자형을 결정하였다. 단, amelogenin gene과 PowerPlex 16 유전자 분석에서 여성으로 판명된 2개의 시료를 제외한 28개의 시료를 대상으로 Y-STR 유전자 분석을 수행하였다.

결 과

1. 미토콘드리아 유전자의 정량

연구대상 시료에서 추출된 mtDNA 양은 절대량이 아닌 K562 표준 DNA에 대한 상대적인 값으로 산출하였다. 50년 이상 경과된 유해에서 추출된 mtDNA의 양은 K562 표준 DNA 0.001-0.017 ng/ul 정도에 해당되었으며, 치아에서 추출된 평균 mtDNA 양(0.008 ng/ul)은 뼈에서 추출된 평균 mtDNA의 양(0.006 ng/ul)에 비해 다소 많기는 하였으나 (Table 2), 두 시료에서 추출된 DNA의 양에는 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$).

또한, mtDNA의 35 cycle PCR 후 전기영동 gel에 나타난 PCR 생성물의 농도는 형광상측정법으로 측정된 시료의 양과 대체로 일치하였으며, 40 cycle PCR에서는 모든 시료에서 염기서열분석에 충분한 정도의 PCR 생성물을 얻을 수 있었다 (Fig. 1).

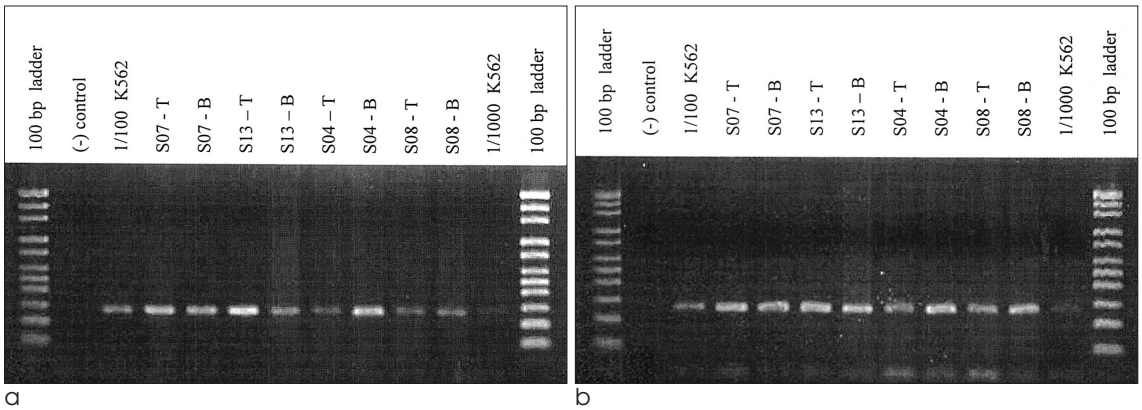
2. 핵 유전자의 정량

nDNA 정량에 사용된 amelogenin 유전자는 2개의 시료(S06-T, S08-T)에서 X, Y peak가 모두 나타나지 않아 시료의 농도를 산출할 수 없었다. X, Y peak 중 1개의 peak가 소실된 5개 시료(S03-T, S04-B, S08-B, S09-T, S14-B)의 농도는 0.001- 0.005 ng/ul 정도로 평가되었으며, 나머지 시료의 농도는 0.009-0.219 ng/ul 정도로 계산되었다. 뼈에서 추출된 nDNA의 평균 농도는 0.036 ng/ul, 치아에서 추출된 평균 nDNA의 양은 0.050 ng/ul이었으나, 두 시료에서 추출된 nDNA의 농도에는 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$, Table 2). 한편, mtDNA와 nDNA에서 추출된 DNA 농도의 상관도는 0.343이었다 (Table 2).

3. Powerplex 16 STR 유전자 분석

Powerplex 16 체계에 포함되어 있는 amelogenin 유전자 역시 nDNA의 정량 때와 마찬가지로 2개의 시료에서는 peak를 관찰할 수 없었으며, 5개의 시료에서는 X, Y peak 중 어느 하나가 소실되었다.

Amelogenin 유전자는 시료의 93.3%에서 증폭 되었으며, D5S818(86.8%), D13S317(86.7%), vWA(83.4%)의 순으로 PCR 성공률이 높았다(Table 3). 이들 유전자들의 PCR 산물의 크기는 모두 200



a b

Fig. 1. An agarose gel electrophoresis of mtDNA PCR products.
a. Band intensity was contrasted among samples according to DNA concentration after 35 PCR cycles. b. After 40 PCR cycles, all PCR products were enough to analysis mtDNA sequences.

bp 이하였다. 가장 낮은 PCR 성공률을 보인 STR 유전자는 Penta E(40.0%)이었으며, FGA 유전자는 300 bp이상의 크기를 가지는 STR 중 PCR 성공률이 66.7%로 가장 높았다 (Table 3). 평균적으로 PCR 생성물의 크기가 200 bp 보다 작은 STR 유전자는 83.9%, 200 - 260 bp 사이의 STR 유전자는 73.4%, 260 bp 보다 큰 STR 유전자는 53.9%의 증폭 성공률을 보였다.

13개 이상의 STR 유전자가 증폭된 것은 30개의 시료 중 모두 16개(53.3%)로서 평균 0.071 ng/ul의 농도로, 15개의 STR 유전자가 증폭되었다. 9 - 12개의 STR 유전자가 증폭된 시료는 5개(16.7%)이며 260 bp 이상의 STR 유전자가 주로 증폭되지 않았다. 8개 이하의 STR 유전자가 증폭된 시료는 9개(30.0%)로 200 bp 이하의 유전자도 6개 중 2.9개 정도만 증폭되었다 (Table 4).

4. Y - STR 유전자 분석

Y - STR 유전자 중에는 DYS392 유전자가 78.6%의 PCR 증폭 성공률을 보였으며, 다음으로는 DYS389 - I, DYS393, DYS391이 모두 75.1%의 PCR 증폭 성공률을 나타내었다. 이들은 모두 180bp 이하의 PCR 생성물 크기를 가지고 있는 STR 유전자였다. DYS385는 그 크기가 230 bp 이상임에도 불구하고 64.3% 성공률을 보이는 반면, DYS19 유전자는 그 크기가 186 - 202 bp 정도임에도 불구하고 32.2%만이 PCR 증폭에 성공하였다 (Table 5). PCR 생성물의 크기가 180 bp 보다 작은 STR 유전자는 76.0%, 180 - 230 bp 사이의 STR 유전자는 46.5%, 230 bp 보다 큰 STR 유전자는 50.0%의 증폭 성공률을 보였다.

8개 Y - STR 유전자 중 7개 이상의 STR이 증폭된 것은 28개의 시료 중 9개(32.1%)로서 평균 7.7개의 STR이 증폭되었으며, 시료의 평균 DNA 농도는 0.075 ng/ul 이었다. 5 - 6개의 유전자가 증폭된 것은 10개(35.7%)로서 평균 5.2개의 STR이 증폭되었다. 한편, 4개 이하의 유전자가 증폭된 시료는 9개(32.1%)로 평균 2.0개의 STR 유전자만 증폭되었으며, 180 bp 이하의 STR 유전자도 4개 중 1.8개만 증폭되었을 뿐이었다 (Table 6).

고 찰

시료에서 추출된 DNA의 상태를 파악하는 것은 PCR을 이용한 유전자 분석의 전략을 마련하는 데 있어 중요한 지표가 되기 때문에, 미량의 분해된 DNA 시료의 정량은 유전자검사의 해석에서 일관성과 신뢰성 확보에 중요한 역할을 한다. 따라서 법의학적 유전자검사의 대상이 되는 시료에서 추출된 DNA를 정량하는 다양한 방법이 제시되었으며, 최근에는 법의학적 시료의 평가에 다양한 장점이 있는 real - time PCR에 기반한 TaqMan System을 이용한 방법이 많이 보고되고 있다. 그러나, 이 방법은 고가의 전용 장비를 필요로 하고, 관련 형광프라이머 및 probe의 제조에 따르는 추가 비용이 드는 단점이 있기 때문에, 본 연구에

Table 3. Powerplex 16 STR Profiling Results by Loci and Allele Size

Loci	Range (bp)	Number	%
Amelogenin	106, 112	28	93.3
D3S1358	115 - 147	26	86.7
TH01	156 - 195	23	76.7
D21S11	203 - 259	23	76.7
D18S51	290 - 366	15	50.0
Penta E	379 - 474	12	40.0
D5S818	119 - 155	26	86.8
D13S317	176 - 208	23	76.7
D7S820	215 - 247	21	70.0
D16S539	264 - 304	20	66.8
CSF1PO	321 - 357	14	46.7
Penta D	376 - 449	16	53.4
vWA	123 - 171	25	83.4
D8S1179	203 - 247	22	73.4
TPOX	262 - 290	16	53.4
FGA	322 - 444	20	66.7
Mean		11.0	80.2
Size group	< 200bp loci (n=6)	5.0	83.9
	200 - 260 bp loci (n=3)	2.2	73.4
	> 260 bp loci (n=7)	3.8	53.9

Table 4. Powerplex 16 STR Profiling Results by Range of Amplified Loci

Range of Amp. loci	0 - 8 loci	9 - 12 loci	13 - 16 loci
Sample number	9 (30.1%)	5 (16.7%)	16 (53.3%)
Mean sample Conc. (ng/ul)	0.003	0.022	0.071
Mean No. of Amp. loci			
All loci (n=16)	4.0	10.8	15.0
< 200 bp loci (n=6)	2.9	6.0	5.9
200-260 bp loci (n=3)	0.7	2.6	2.9
> 260 bp loci (n=7)	0.4	2.2	6.2

서는 PCR 장비와 자동염기서열분석기와 같은 법의학 실험실의 기본 장비를 사용하여 간단하게 mtDNA와 nDNA를 정량하는 방법을 제시하여 보았다. 즉, 일반적으로 쉽게 구할 수 있는 K562 표준 DNA를 차례로 희석한 것과 시료에서 추출된 DNA에 대하여 동일한 조건에서 형광프라이머를 이용하여 PCR을 수행한 후 통상의 방법에 따라 자동염기서열분석기에서 전기영동하였다. GeneScan 상의 peak 면적을 바탕으로 연속 희석된 K562 표준 DNA 농도 표지의 standard curve를 최소자승법으로 구하였고, 이 curve를 참고하여 시료에서 추출된 mtDNA와 nDNA의 상대적 양을 각각 비교 측정하는 방법을 사용하였다.

mtDNA의 정량은 일반적으로 그 copy 수를 정하는 방법이 많이 알려져 있으나, 실제 검사에서는 시료에서 추출된 전체 DNA를 정량하고, 이 값에 따라 유전자 분석의 전략을 마련하는 것이 더욱 간편한 방법이다. 따라서 본 연구에서는 K562 표준 DNA에 대한 상대적인 양으로 mtDNA의 양을 정량하여, mtDNA의 염기서열을 분석하기 위한 PCR 지표로 평가해 보았다. 50년 이상 경과된 유해에서 추출된 mtDNA의 양은 K562 표준 DNA 0.001 - 0.017 ng/ul 정도에 해당되었으며, mtDNA의 정량값과 35 cycle PCR 후 젤에 나타난 생성물의 농도는 대체로 일치하였는 바, 본 연구에서 적용된 mtDNA 정량법이 실제 mtDNA의 PCR과 염기서열분석에 좋은 자료로 활용될 수 있음을 알 수 있다. 연구대상 시료의 농도는 control DNA로 사용된 K562 표준 DNA의 0.001 ng/ul에 해당하였으며, 40 cycle의 PCR 후에는 대부분의 시료들이 염기서열분석을 수행하기에 충분할 정도의 PCR 생성물을 얻을 수 있었다.

Amelogenin gene을 이용한 nDNA의 정량에서 2개의 시료는 X, Y peak가 모두 나타나지 않았으며, 5개의 시료는 1개의 peak가 소실되어 그 농도는 0.005 ng/ul 이하로 산출되었다. 나머지 연구대상 시료에서 추출된 nDNA의 양은 0.009 - 0.219 ng/ul 정도로 평가되었다. 사람의 세포 한 개에 있는 DNA의 양이 0.003 ng 정도임을 고려해 볼 때[23], 본 연구에서 제시한 nDNA 정량법의 민감도는 3 copy/ul의 nDNA 정도이며, 이는 매우 민감한 것으로 판단된다. 이러한 결과는 PowerPlex 16 체계 속에 있는 amelogenin gene의 결과와 대부분 일치하며, PowerPlex 16 체계의 상염색체 STR과 Y - STR의 프로필 분석 정도와도 일관성을 유지하였다. 따라서, 미량의 분해된 DNA 시료를 대상으로 하는 유전자검사에서 amelogenin gene을 이용한 PCR 정량을 수행하면 시료의 DNA 농도를 매우 정확하게 측정할 수 있을 뿐 아니라, STR 유전자 분석의 결과를 예측할 수 있기 때문에 소량의 시료를 가장 효율적으로 사용할 수 있게 될 것이다. 또한, amelogenin gene을 이용한 PCR 정량으로 사체의 개인식별에 있어 가장 기본이 되는 성별에 대한 정보도 획득할 수 있다.

연구대상 시료에서 추출된 mtDNA 양과 nDNA 양과의 상관도는 0.343 정도로 큰 상관관계가 없는 것으로 나타났는데, 이는 mtDNA의 정량시에는 221 bp의 PCR 생성물을 기준으로 하였으나, nDNA 정량시에는 106, 112 bp의 PCR 생성물을 기준으로 하였기에 DNA의 분해 정도에 따른 영향이 어느 정도 작용한 것으로 생각된다. 한편, 일반적으로 치아에서 추출된 DNA의 양이 뼈에서 추출된 DNA의 양보다 많다고 알려져 있으나[17, 24], 본 연구에서는 mtDNA 및

Table 5. Y-chromosomal STR Profiling Results by Loci and Allele Size

Loci	Range (bp)	Number	%
DYS392	104 - 122	22	78.6
DYS389-I	150 - 170	21	75.1
DYS19	186 - 202	9	32.2
DYS389-II	266 - 286	10	35.8
DYS393	120 - 132	21	75.1
DYS391	151 - 167	21	75.1
DYS390	204 - 224	17	60.8
DYS385	245 - 301	18	64.3
Mean		5.0	62.1
Size group	< 180 bp loci (n=4)	3.1	76.0
	180 - 230 bp loci (n=2)	0.9	46.5
	> 230 bp loci (n=2)	1.0	50.0

Table 6. Y-chromosomal STR Profiling Results by Range of Amplified Loci

Range of Amp. loci	0 - 4 loci	5 - 6 loci	7 - 8 loci
Sample number	9 (32.1%)	10 (35.7%)	9 (32.1%)
Mean sample Conc. (ng/ul)	0.004	0.038	0.075
Mean No. of Amp. loci			
All loci (n=8)	2.0	5.2	7.7
< 180 bp loci (n=4)	1.8	3.3	4.0
180 - 230 bp loci (n=2)	0.1	0.8	1.9
> 230 bp loci (n=2)	0.1	1.1	1.8

nDNA 모두 치아에서 추출된 평균 DNA의 양이 약간 많기는 하였으나 유의한 차이는 없었다. 이러한 결과는 인체 조직의 특성이 DNA를 보호하는데 어느 정도로 영향을 주겠지만, 조직이 놓여진 환경이 DNA의 보존에 더 큰 영향을 주는 것으로 보아야 할 것 같다.

Powerplex 16 체계에 포함된 각개의 STR 유전자 중 D3S1358, D5S818, vWA는 83.4% 이상의 PCR 증폭 성공률 보였고, TH01, D13S317 유전자도 76.7%의 시료에서 PCR 증폭되어 200 bp 이하의 크기를 가진 STR 유전자는 평균 83.9%의 시료에서 PCR 증폭이 성공하였으며, 200 - 260 bp의 크기를 가진 STR 유전자도 평균 73.4%의 시료에서 PCR 증폭이 성공하였다. 반면, 전체 30개 시료에서 260 bp 보다 큰 STR 유전자의 PCR 증폭 성공률은 평균 53.9% 밖에 되지 않으며, 9 - 12개의 STR이 증폭된 시료에서는 260 bp 이상의 크기를 가진 7개의 유전자 중에 2.2개만이 PCR 증폭되는 등 대립유전자의 PCR 생성물 크기가 큰 STR 유전자가 잘 증폭되지 않는 현상이 뚜렷하게 관찰되었다. 따라서, 최근에 Butler 등[25]이 제시한 것처럼 이들과 같이 PCR 생성물의 크기가 큰 STR 유전자를 대상으로 그 크기를 줄일 수 있다면, 전체적으로 약 70.0%의 연구대상 시료에서 13개 이상의 STR 유전자의 분석이 가능할 것으로 기대된다. 한편, 8개 이하의 STR 유전자가 증폭된 9개 (30.0%) 시료의 평균 DNA 농도는 0.003 ng/ul이며, 200 bp 이하의 크기를 가진 STR 유전자도 6개중 평균 2.9개만 PCR 증폭되는 것으로 보아, 미량의 분해된 DNA 시료의 STR 분석을 위해서는 PCR 생성물의 크기를 줄이는 것 뿐 아니라 최소한의 주형 DNA를 확보하는 것도 중요하다는 것을 알 수 있다. 같은 맥락에서 0.050 ng/ul 이하의 K562 표준 DNA 시료에서는 대립유전자 소실 현상이 자주 관찰되었고, 13개 이상의 STR이 성공적으로 증폭된 연구대상 시료의 평균 DNA 농도가 0.071 ng/ul이라는 점을 종합해 볼 때, STR 유전자 분석에서 최상의 결과를 얻기 위해서는 주형 DNA의 농도를 0.100 ng/ul 이상은 확보하여야 할 것으로 보이며, 이러한 결과는 Gill 등[12, 13]의 보고와 일치한다 하겠다.

Park 등이 사용한 Y - STR minimum haplotype의 결정을 위한 multiplex PCR 체계로도 본 연구대상 시료에 대하여 DNA 프로필 분석 정도를 시험해 보았는데, PowerPlex 16에 비하여 PCR 성공률이 높지는 않았지만 대체로 비슷한 결과를 얻을 수 있었다. Amelogenin gene과 PowerPlex 16 상염체 STR 유전자 분석에서 여자로 밝혀진 2개의 시료를 제외하고 28개의 시료를 대상으로 수행된 Y - STR 유전자 분석에서, 180 bp 이하의 크기를 가진 STR 유전자는 76.0% 이상의 PCR 증폭 성공률을 보였으나, 180 bp 이상의 크기를 가진 STR 유전자는 50.0% 이하의 PCR 증폭 성공률을 보였다. 또한, 추출된 DNA의 농도가 높을 수록 PCR 증폭에 성공한 STR 유전자의 수가 많았으며, 4개 이하의 유전자가 증폭된 9개 (32.1%) DNA 시료의 평균 농도는 0.004 ng/ul로 180bp 이상의 크기를 가진 STR 유전자는 거의 증폭되지 않았고, 180 bp 이하의 크기를 갖는 4개의 STR 유전자도 평균 1.8개 PCR 증폭되는 등 PowerPlex 16 체계의 상염색체 STR 유전자 분석 결과와 거의 비슷한 양상으로 나타났다. 한편, DYS385는 minimum haplotype Y - STR 중에서 식별력이 가장 높고, 그 크기가 230bp 이상임에도 불구하고 64.3%의 PCR 성공률을 나타내기 때문에 미량의 분해된 DNA 시료의 분석에 유용할 것으로 판단되며, DYS19의 경우에는 그 크기가 186 - 202 bp임에도 불구하고 PCR 증폭 성공률이 32.2%에 지나지 않아, 미량의 분해된 DNA 시료에 적용하기 위해서는 새로운 프라이머의 고안이 필요하리라 생각된다. 미량의 분해된 DNA를 대상으로 STR 유전자 분석을 수행할 때 나타나는 가장 큰 문제 중의 하나는 대립유전자의 소실이나 추가 현상인데, 상염색체 STR 유전자는 그 특성상 보통 2개의 대립유전자가 존재하기 때문에 이러한 현상에 대한 오류를 검증하기가 어려운 경우가 빈번하다. 반면, Y - STR 유전자는 일반적으로 1개의 유전좌에 1개의 대립유전자가 존재하기 때문에 상염색체 STR 유전자 분석에서 나타나는 문제점을 보완할 수 있는 여지가 있다고 본다. 특히 우리나라에서는 부계혈통을 중시하는 문화적 환경으로 인하여 Y - STR 유전자검사가 필요한 경우가 많으며, 최근 국가적 사업으로 수행되고 있는 6 · 25 전사자 유해의 대부분이 남자라는 점을 고려해 볼 때, 미량의 분해된 시료를 대상으로 하는 Y - STR 유전자 분석법의 최적화에도 많은 관심을 두고 연구하여야 할 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서는 미량의 분해된 DNA 시료의 유전자 검사의 해석에서 일관성과 신뢰성 확보에 중요한 DNA

정량을 간단하게 수행할 수 있는 방법을 제시하였다. 연속으로 희석된 K562 표준 DNA를 농도 표지로 하여 PCR로 얻은 DNA의 양을 비교 측정하는 방법을 사용하여 50년 이상 경과된 뼈와 치아로부터 추출된 DNA의 mtDNA와 amelogenin gene을 대상으로 형광 프라이머를 하는 PCR 정량을 수행할 수 있었다. 뼈와 치아 시료에서 추출된 mtDNA와 nDNA의 양을 비교해 보았을 때, 두 시료에서 추출된 DNA의 양에는 유의한 차이가 없었다.

미량의 분해된 DNA 시료에 대하여 DNA 프로필 분석의 효율성을 평가해 보고자, mtDNA PCR 에 대한 평가와 더불어 16개의 상염색체 STR 및 9개의 Y 염색체 STR 유전자 분석을 수행하였고, 이를 바탕으로 정량된 DNA 양과 PCR 증폭 정도와의 상관관계를 평가해 보았다. 본 연구에서 제시한 간단한 정량법으로 측정된 DNA 양은 mtDNA와 STR 유전자 분석에 좋은 지표로 사용될 수 있음을 알 수 있었다. PCR 증폭에서 주형으로 이용되는 DNA 양이 0.050 ng 이하인 시료에서는 대립유전자 소실 현상이 나타나기 때문에 STR 유전자 분석에서 최상의 결과를 얻기 위해서는 주형 DNA의 농도를 최소한 0.100 ng 이상은 확보하여야 할 것으로 판단된다. 또한, 200 bp 이하의 크기를 가진 대부분의 STR 유전자는 PCR 증폭이 성공적으로 수행되는 바, 미량의 분해된 DNA 시료에서의 유전자 분석 효율성을 증대시키기 위해서는 200 bp 이하의 크기를 갖는 mini - STRs의 개발이 필요하다고 본다. Y 염색체 STR은 대립유전자 소실이나 추가를 보다 용이하게 판별할 수 있는 특징을 지니고 있으므로, 미량의 분해된 DNA 시료의 분석을 위한 효과적인 상염색체 STR 분석법뿐 아니라 Y 염색체 STR 유전자 분석법도 확립되어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Lygo JE, Johnson PE, Holdaway DJ, et al. The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework. Int J Legal Med 1994;107:77-89
2. Butler JM. Forensic DNA typing: biology and technology behind STR markers. London: Academic Press, 2001
3. Budowle B, Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, Keys KM. Population data on the thirteen CODIS core short tandem repeat loci in African Americans, U.S. Caucasians, Hispanics, Bahamians, Jamaicans, and Trinidadians. J Forensic Sci 1999;44:1277-86
4. Wilson MR, DiZinno JA, Polanskey D, Replogle J, Budowle B. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. Int J Legal Med 1995;108:68-74
5. Holland MM, Parsons TJ. Mitochondrial DNA sequence analysis - validation and use of forensic casework. Forensic Sci Rev 1999;11:21-50
6. Bar W, Kratzer A, Machler M, Schmid W. Postmortem stability of DNA. Forensic Sci Int 1988;39:59-70
7. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature 1993;362:709-15
8. Hoss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Paabo S. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. Nucleic Acids Res 1996;24:1304-7
9. Handt O, Krings M, Ward RH, Paabo S. The retrieval of ancient human DNA sequences. Am J Hum Genet 1996;59:368-76
10. Navidi W, Arnheim N, Waterman MS. A multiple-tubes approach for accurate genotyping of very small DNA samples by using PCR: statistical considerations. Am J Hum Genet 1992;50:347-59
11. Taberlet P, Griffin S, Goossens B, et al. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. Nucleic Acids Res 1996;24:3189-94
12. Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J. An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. Forensic Sci Int 2000;112:17-40
13. Gill P. Application of low copy number DNA profiling. Croat Med J 2001;42:229-32
14. Alonso A, Martin P, Albarran C, et al. Specific quantification of human genomes from low copy number DNA samples in forensic and ancient DNA studies. Croat Med J 2003;44:273-80
15. Andreasson H, Gyllensten U, Allen M. Real-time DNA quantification of nuclear and mitochondrial DNA in forensic analysis. Biotechniques 2002;33:402-4, 407-11
16. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5 '-3 ' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:7276-80
17. Alonso A, Andelinovic S, Martin P, et al. DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. Croat Med J 2001;42:260-6
18. Holland MM, Cave CA, Holland CA, Bille TW. Development of a quality, high throughput DNA analysis procedure for skeletal samples to assist with the identification of victims from the World Trade Center attacks. Croat Med J 2003;44:264-72
19. de Knijff P, Kayser M, Caglia A, et al. Chromosome Y microsatellites: population genetic and evolutionary aspects. Int J Legal Med 1997;110:134-49
20. Park MJ, Lee HY, Yoo JE, Chung U, Lee SY, Shin KJ.

Forensic evaluation and haplotypes of 19 Y-chromosomal STR loci in Koreans. Forensic Sci Int Submitted
21. Sweet D, Hildebrand D. Recovery of DNA from human teeth by cryogenic grinding. J Forensic Sci 1998;43:1199-202
22. Yang DY, Eng B, Waye JS, Dudar JC, Saunders SR. Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. Am J Phys Anthropol 1998;105:539-43
23. Jeffreys AJ, Tamaki K, MacLeod A, Monckton DG, Neil DL, Armour JA. Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites. Nat Genet 1994;6:136-45
24. Hummel S, Schultes T, Bramanti B, Herrmann B. Ancient DNA profiling by megaplex amplications. Electrophoresis 1999;20:1717-21
25. Butler JM, Shen Y, McCord BR. The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. J Forensic Sci 2003;48:1054-64